



WARSZAWSKI UNIwersYTET MEDYCZNY
MEDICAL UNIVERSITY OF WARSAW

Klinika Otorynolaryngologii

Recenzja rozprawy na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne
lek. Katarzyny Stawarz pt.

“Zmiany molekularne w raku gruczołowo-torbielowatym gruczołów ślinowych”.

zrealizowanej w

Zakładzie Immunoterapii Eksperymentalnej Narodowego Instytutu Onkologii Państwowego
Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej -Curie w Warszawie

pod kierunkiem

Promotora: dr hab. Elżbiety Sarnowskiej, Profesor Instytutu
oraz Promotora Pomocniczego: dr n. biol. Natalii Rusetskiej

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Zmiany molekularne w raku gruczołowo-torbielowatym gruczołów ślinowych” dotyczy nieczęstego, ale niezwykle trudnego w leczeniu typu nowotworu wywodzącego się z gruczołów ślinowych.

Rak gruczołowo-torbielowaty (ACC) jest rzadkim nowotworem, stanowiącym około 1% wszystkich nowotworów złośliwych głowy i szyi oraz około 10% wszystkich guzów ślinianek. Jest to najczęściej zgłaszany nowotwór złośliwy małych gruczołów ślinowych, ale też występuje w dużych gruczołach ślinowych - przyusznicy, śliniance podżuchwowej czy podjęzykowej. ACC może również obejmować gruczoły łzowe i łojowe a jego lokalizacje poza śliniankami mogą dotyczyć nosa i zatok przynosowych, a także tchawicy i krtani. ACC charakteryzuje się naciekaniami okołonerwowym i okołonaczyniowym i licznymi nawrotami miejscowymi. Regionalne przerzuty do węzłów chłonnych nie są częste. Klinicznie ACC jest uważany za nowotwór o wysokim stopniu złośliwości, w związku z czym leczeniem z wyboru jest radykalna resekcja chirurgiczna z następową radioterapią. Chemioterapia była szeroko badana u pacjentów z zaawansowanym ACC, niemniej jednak powolny przebieg choroby, a także niewielka liczba pacjentów z tego typu nowotworem utrudniają obserwację odpowiedzi klinicznej. Z tego względu temat podjęty przez lekarz Katarzynę Stawarz wydaje się być bardzo interesujący, albowiem każda nowa informacja o biologii ACC może przybliżyć nas do skuteczniejszej, niż obecnie wykorzystywane, metody leczenia.

Badanie przeprowadzone przez Doktorantkę miało charakter retrospektywny. Zostało przeprowadzone na materiale tkankowym pochodzącym od chorych leczonych w Narodowym Instytucie Onkologii w Warszawie.

Praca ma układ typowy, liczy 112 stron i składa się z następujących części: wykaz stosowanych skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wstęp, cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusja, wnioski. Całość zamyka piśmiennictwo, spis rysunków i tabel. Do monografii nie dołączono oświadczenia Komisji Bioetycznej. Zaproponowany podział na rozdziały i ich proporcja jest właściwa.

Spis skrótów i pojęć zawiera dokładne rozwinięcie w języku polskim i angielskim zastosowanych w pracy skrótów.

Spis treści obejmuje szczegółowy wykaz rozdziałów i podrozdziałów pracy, jest czytelny i przejrzysty.

We wstępie rozprawy Doktorantka wprowadza czytelnika w zagadnienia związane z tematem pracy, przede wszystkim skupiając się na przedstawieniu biologii i charakterystyce molekularnej raka gruczołowo-torbielowatego gruczołów ślinowych, a także na analizie dostępnych danych literaturowych odnoszących się do procesów molekularnych, które postanowiła zbadać w swojej pracy. Są to procesy naciekania limfocytarnego w nowotworze, metylacji RNA, regulacji struktury chromatyny, syntezy deoksyrybonukleotydów w fazie S cyklu komórkowego, naprawy DNA i splicingu mRNA.

Autorka w tej części monografii nie ustrzegła się od pewnych błędów i nieścisłości. Na stronie 15. Doktorantka pisze, że ACC stanowi około 10% nowotworów regionu głowy i szyi, choć jest to wartość zdecydowanie za wysoka. Gdyby tak było, z pewnością liczebność grup w niniejsze pracy byłaby większa. Na tej samej stronie podaje, że guz ten w 30-50% lokalizuje się w obrębie małych gruczołów ślinowych (co jest zgodne z danymi literaturowymi), a z kolei na stronie 16 zamieszcza poglądowy rysunek, gdzie oznaczone są jedynie ślinianki przyuszne i podżuchwowe, a sam guz jest zaznaczony w śliniance przyusznej. Może to błędnie sugerować jego najczęstszą lokalizację w tym gruczole.

Na stronie 18. Autorka pisze, że dotychczasowe badania dotyczące zaburzeń genetycznych w ACC były prowadzone z wykorzystaniem "niewłaściwych linii komórkowych". Jest to bardzo istotne stwierdzenie, a co za tym idzie powinno być poparte danymi, które o tym świadczą. Niestety brakuje danych na których Doktorantka opiera takie swoje stwierdzenie.

Na tej samej stronie Autorka zamieszcza zdanie "5-letnie i 10-letnie przeżycie pacjentów z wysoko i średnio zróżnicowanymi formami ACC stanowią odpowiednio 80 i 40%". Czy chodzi o to, że pacjenci z wysoko i średnio zróżnicowanymi formami ACC byli traktowani "łącznie"? Czy jest to pomyłka w prezentowaniu wyników badania?

Na stronie 19. Autorka wskazuje na możliwość wywołania dolegliwości bólowych spowodowane naciekaniem i porażeniem nerwu twarzowego. Jest to prawdopodobnie skrót myślowy, albowiem nerw twarzowy jest niemal wyłącznie nerwem ruchowym.

Na kolejnych 26 stronach Autorka w ciekawy sposób opisuje mechanizmy molekularne których zaburzenia mogą prowadzić do nowotworzenia lub oporności guza na leczenie, a które postanowiła zbadać w swojej pracy doktorskiej w odniesieniu do raka gruczołowo-torbielowatego gruczołów ślinowych.

Doktorantka przedstawiła cele swoich badań w 3 punktach:

Cel 1. Ocena nacieku TILs, w szczególności nacieku limfocytów TCD4 i TCD8 i sprawdzenie zależności korelacji z czasem przeżycia u pacjentów z ACC.

Cel 2. Przeprowadzenie analizy ilości białek METTL3, METTL14, WTAP, BRM, RRM2, PRP19, CDC5L, PLRG1 w guzie pierwotnym, wznowie miejscowej, przerzucie odległym u chorych na ACC.

Cel 3. Ocenę zależności pomiędzy wynikami ekspresji białek METTL3, METTL14, WTAP, BRM, RRM2, PRP19, CDC5L, PLRG1 oraz danymi kliniko-patologicznymi chorych z okresu obserwacji.

Cele pracy są sformułowane jasno i klarownie. Zbędne w tym rozdziale są dodatkowe akapity, które powinny zostać przeniesione do dyskusji, będące rozważaniami Autorki na temat możliwego wykorzystania wyników pracy w planowaniu leczenia ACC, jak również w zrozumieniu mechanizmów modulacji układu odpornościowego przez komórki nowotworowe, do ewentualnego opracowania schematów immunoterapeutycznych.

Analizie poddano 48 próbek tkankowych, z czego 37 to guzy pierwotne, 5 to przerzuty a 6 preparatów pochodziło ze wznowy. Nie ma danych na temat tego, czy materiał tkankowy określony jako "przerzut" pochodził od pacjentów od których mamy też tkankę guza pierwotnego. Autorka nie podaje w podrozdziale "Charakterystyka pacjentów" informacji na temat tkanek zdrowych które poddawała analizie. Jedyna informacja o wykonaniu analiz na tkankach zdrowych którą odnalazłem (cztery preparaty) znajduje się na stronie 70 i 71.

W mojej ocenie metodologia badania została zaplanowana prawidłowo, a niewielka liczebność grup może być tłumaczona rzadkim występowaniem raka gruczołowo-torbielowatego i z tego powodu ograniczonym dostępem do tkanek tego typu guza.

Wyniki badania Doktorantka poddała analizie statystycznej wykorzystując program R w wersji 4.2.1. Test Shapiro-Wilka został użyty do oceny rozkładu zmiennych. Poziomy badanych parametrów porównywano między trzema lub czterema grupami przy pomocy testu Kruskala-Wallisa lub testu ANOVA (w zależności od tego czy rozkład zmiennych był normalny), a w przypadku dwóch grup stosowano test U Manna-Whitney'a.

Zebrane wyniki zostały przedstawione w postaci 19 rycin i 30 tabel.

Doktorantka w swoich badaniach obserwowała wzrost ilości białka BRM w tkance nowotworowej, natomiast w przypadku RRM2 obniżenie ilości wybarwionych komórek, jednak z intensywnym barwieniem w pojedynczych komórkach, świadczącym o lokalnej nadekspresji RRM2 w pojedynczych komórkach ACC. Kolejnymi badanymi białkami były podjednostki kompleksu NTC, gdzie obserwowano wyraźnie zwiększoną ilość białek PRP19 i PLRG1, natomiast jedynie nieznacznie podniesioną ekspresję CDC5L.

Oceniane składniki kompleksu metylującego mRNA (WTAP, METTL3, METTL14) wykazały podobny procent komórek wybarwionych w tkance guza w porównaniu do tkanki zdrowej, przy czym dla WTAP i METTL3 w tkance nowotworu obserwowano obniżenie intensywności wybarwienia liczonej indeksem histologicznym H-score.

Analiza nacieku limfocytów T w mikrośrodowisku guza ACC wskazała, że w nowotworze w większym stopniu obserwowano naciek z limfocytów TCD4+ niż CD8+. Nie wykonano oceny naciekania limfocytów T dla tkanki zdrowej.

W kolejnych podrozdziałach "Wyników" Autorka analizowała ilości badanych białek w zależności od zaawansowania choroby, od podtypu histologicznego ACC, a także od stadium TNM choroby nowotworowej. Jedyne różnice istotne statystycznie Autorka badania potwierdziła dla białka WTAP i METTL14 w zależności od zaawansowania choroby. Żadne z badanych białek nie różnicowało podtypu histologicznego ACC gruczołów ślinowych, a naciek limfocytów T był podobny w każdej grupie. Podobnie w przypadku zależności od stadium choroby TNM, żadne z badanych białek nie różnicowało chorych w poszczególnych grupach, a naciek limfocytów T był podobny w każdej grupie. Nie stwierdzono też istotnych korelacji pomiędzy naciekiem limfocytów T a ilością badanych białek w nowotworze ACC gruczołów ślinowych.

Ostatnim podrozdziałem "Wyników" jest analiza czynników mających wpływ na ryzyko zgonu pacjenta z rozpoznaniem ACC gruczołów ślinowych. Doktorantka potwierdziła, że istotnym czynnikiem ryzyka zgonu jest podtyp lity w porównaniu z cewkowym, ale też ilość białka WTAP i procentowa ilość białek METTL14.

W mojej ocenie wskazane byłoby włączenie analizy tkanek zdrowych do tabel porównujących poziomy poszczególnych badanych białek w guzie pierwotnym, przerzucie i wznowie. Dodatkowo ilość tkanek zdrowych liczebnie powinna być większa niż $n=4$.

Wiele akapitów zawartych w rozdziale "Wyniki" powinno zostać przeniesionych do rozdziału "Dyskusja" lub "Wstęp".

Rysunek 27 na stronie 87 jest całkowicie niezrozumiały - brak w nim legendy.

Dyskusja napisana została w sposób poprawny. Doktorantka odnosi wyniki swoich badań do danych literaturowych. W interesujący sposób opisuje rolę poszczególnych białek i dyskutuje wyniki swoich badań na tle innych publikacji. Autorka sugeruje, że białka kompleksu metylotransferaz mogą pełnić funkcję supresora procesu nowotworzenia, gdyż notowany był wyraźny spadek podjednostek tego kompleksu w przerzutach, w przeciwieństwie do tkanki guza pierwotnego czy wznowy. Jak pisze Autorka "najistotniejszym wnioskiem z przeprowadzonej analizy jest silna korelacja białka BRM z naciekiem limfocytów TCD8+ oraz wpływ białka WTAP na rokowanie pacjentów z ACC gruczołów ślinowych". Należy podkreślić, że znamienności statystyczne nie są wyjątkowo wysokie, jednak można to tłumaczyć nielicznymi grupami, zatem wyniki te wymagają dalszych badań.

Wnioski odnoszą się do uprzednio sformułowanych celów pracy, jednak nie w sposób typowy, gdzie każdemu celowi pracy odpowiada pojedynczy wniosek. Autorka sformułowała 10 wniosków, które wynikają bezpośrednio z przeprowadzonych badań. Jedynym, w mojej ocenie, wnioskiem, który nie wynika z przeprowadzonych badań jest informacja, że z uwagi na nadekspresję białka BRM, w ACC gruczołów ślinowych występuje zaburzona regulacja struktury chromatyny. To nie zostało zbadane, a sama nadekspresja białka nie jest jednoznaczna z sugerowanym przez Autorkę zaburzeniem.

Rozprawę kończy zestawienie 151 pozycji piśmiennictwa zarówno polskiego, jak i anglojęzycznego, spis rysunków i tabel.

Rozprawa napisana jest poprawnie językowo, a nieliczne uchybienia stylistyczne, nie umniejszają jej wartości. Materiały graficzne - tabele i ryciny ułatwiają analizę badań.

Podsumowując, chciałbym prosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących punktów:

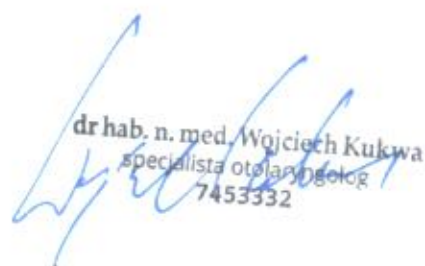
- 1/ Dlaczego ograniczyła Pani ilość badanych tkanek zdrowych do 4 preparatów?
- 2/ Dlaczego nie pokazała Pani analizy ilościowej również dla tkanek zdrowych w odniesieniu do poszczególnych białek? - np. w podrozdziale V.7, tak, żeby w jednej tabeli były wartości dla tkanek zdrowych, guza, przerzutu i wznowy?
- 3/ Dlaczego nie ma wartości liczbowych dla wyników zobrazowanych na rycinie 12 (strona 59) i podobnych z kolejnych stron?
- 4/ Czy Doktorantka samodzielnie wykonywała analizy poziomu mRNA? - rysunek 14 i 17? – Informacje na ten temat nie są podane w „Metodach”.
- 5/ Podaje Pani, że ilość PRP19 i PLRG1 jest "znacząco zwiększona" w ACC – w pracy nie mogę odnaleźć żadnych wartości liczbowych, a jedynie obrazek 15. Co z tego wynika?
- 6/ Dlaczego w podrozdziale V.6 osobno są dane statystyczne dla poszczególnych białek w guzie, a następnie, w odrębnej tabeli 11 dane (średnia +/-SD) dla tkanek zdrowych? Jakie wnioski płyną z tego podrozdziału?
- 7/ We „Wstępie” pisze Pani, że „dotychczasowe badania dotyczące zaburzeń genetycznych w ACC były prowadzone z wykorzystaniem niewłaściwych linii komórkowych”. Na jakiej podstawie opiera się ta informacja? W tekście nie ma odnośnika do bibliografii, a informacja ta wydaje się bardzo istotna.

Recenzując przedstawioną pracę stwierdzam, że:

1. Praca lek. Katarzyny Stawarz jest samodzielnym dorobkiem Doktorantki.
2. Dobór tematyki pracy był właściwy, a zastosowana metodologia adekwatna.
3. Materiał obejmował nieliczną grupę pacjentów, jednak należy podkreślić, że badany typ nowotworu należy do bardzo rzadkich.
4. Doktorantka wykazała się odpowiednią znajomością zagadnienia i umiejętnościami korzystania z literatury.

Reasumując, stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Katarzyny Stawarz, napisana pod kierunkiem merytorycznym dr hab. Elżbiety Sarnowskiej **spełnia warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz. 595 z późn, zm.)** w związku z art. 179 ust. 1 ustawy z dnia 3 lipca 2018r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018r. poz. 1669 z późn, zm.).

Przedkładam wniosek Wysokiej Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych Narodowego Instytutu Onkologii Państwowego Instytutu Badawczego im. Marii Skłodowskiej -Curie w Warszawie o dopuszczenie Pani Lekarki Katarzyny Stawarz do dalszych etapów przewodu doktorskiego.


dr hab. n. med. Wojciech Kukwa
specjalista otolaryngolog
7453332